

**Method for the treatment of bone tissues and implantable biomaterials thereof.****Publication number:** EP0603920 (A1)**Publication date:** 1994-06-29**Inventor(s):** FAGES JACQUES [FR]; MARTY ALAIN [FR]; COMBES DIDIER [FR]; CONDORET JEAN-STEPHANE [FR]**Applicant(s):** BIOLAND SARL [FR]**Classification:****- international:** A61F2/28; A61F2/46; A61L24/00; A61L27/00; A61L27/36; A61F2/28; A61F2/46; A61L24/00; A61L27/00; (IPC1-7): A61L27/00**- European:** A61L2/00P4A; A61F2/46G; A61L24/00F; A61L27/36**Application number:** EP19930203267 19931123**Priority number(s):** FR19920015577 19921221**Also published as:**

EP0603920 (B1)

JP6218036 (A)

GR3030429 (T3)

FR2699408 (A1)

ES2130216 (T3)

more &gt;&gt;

**Cited documents:**

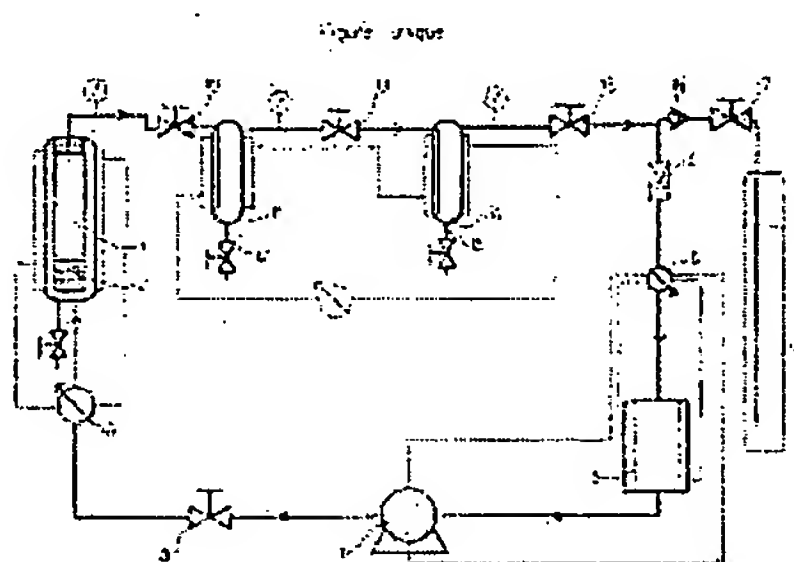
WO8703812 (A1)

GB2175506 (A)

WO9107194 (A1)

**Abstract of EP 0603920 (A1)**

The present invention relates to a method for treating bone tissues of animal or human origin, and a corresponding implantable biomaterial. According to the present invention, a fluid in the supercritical state is made to penetrate throughout the bone tissue. The bone tissue thus treated may then undergo stages of extraction of specific proteins. This tissue is ready to be fitted on a damaged bone tissue and has mechanical properties at least equivalent to those of natural bone.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Numéro de publication: **0 603 920 A1**

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

Numéro de dépôt: 93203267.5

Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61L 27/00**

Date de dépôt: 23.11.93

Priorité: 21.12.92 FR 9215577

Date de publication de la demande:  
29.06.94 Bulletin 94/26

Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE

Demandeur: **BIOLAND Société à  
Responsabilité Limitée**  
132, route d'Espagne  
F-31100 Toulouse(FR)

Inventeur: **Fages, Jacques**  
12, Impasse Saguens

F-31120 Portet sur Garonne(FR)

Inventeur: **Marty, Alain**

10, Chemin du Rat

F-31400 Toulouse(FR)

Inventeur: **Combes, Didier**

10 place de la Tour Eiffel

F-31750 Escalquens(FR)

Inventeur: **Condoret, Jean-Stéphane**

13, rue Guyou

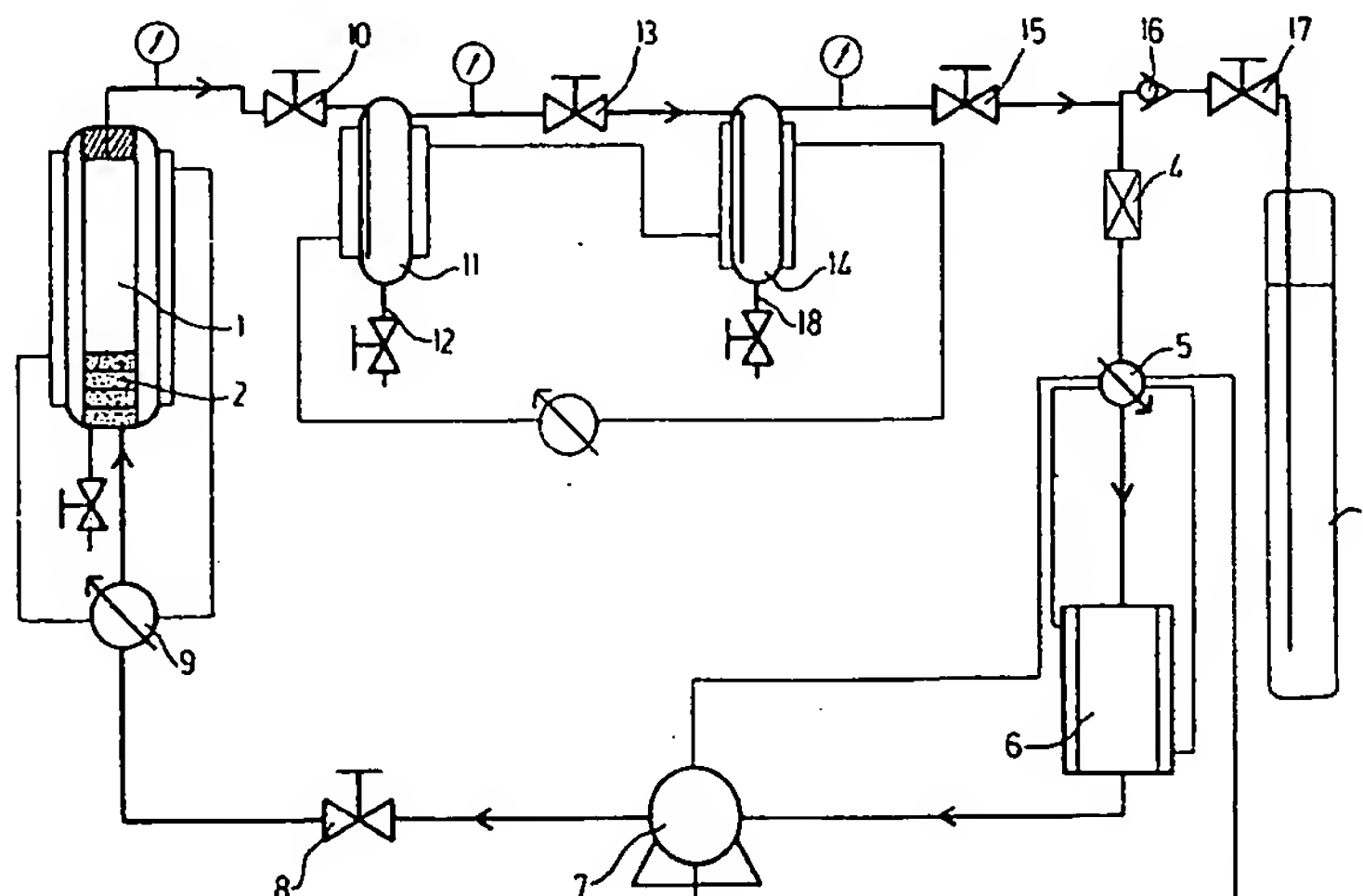
F-31400 Toulouse(FR)

Mandataire: **Barre, Philippe**  
**Cabinet Barre Laforgue et associés**  
95 rue des Amidonniers  
F-31000 Toulouse (FR)

Procédé de traitement de tissus osseux et biomatériaux implantables correspondants.

La présente invention concerne un procédé de traitement de tissus osseux d'origine animale ou humaine, et un biomatériau implantable correspondant. Selon la présente invention, on fait pénétrer un fluide à l'état supercritique dans la totalité du tissu osseux. Le tissu osseux ainsi traité peut ensuite subir des étapes d'extraction de protéines spécifiques. Ce tissu est appelé à être mis en place sur un tissu osseux lésé et présente des propriétés mécaniques au moins équivalentes à celles de l'os naturel.

Figure unique



EP 0 603 920 A1

La présente invention concerne un procédé de traitement de tissus osseux et des biomatériaux implantables correspondants.

Plus particulièrement, un tel procédé permet de traiter un tissu osseux en vue de son implantation chez l'homme. Un tel tissu ne doit pas provoquer de rejet (ou du moins le moins possible), et doit présenter une  
5 bonne capacité ostéoconductrice, c'est-à-dire, qu'il doit autoriser la formation et la migration de tissu osseux néoformé par le receveur.

La greffe de tissu osseux est une technique utilisée quotidiennement dans la plupart des services de chirurgie orthopédique à travers le monde. Ces greffes peuvent être de trois types à savoir :

- les allogreffes,
- 10 - les autogreffes,
- les xénogreffes.

Les allogreffes osseuses consistent à transplanter du tissu osseux d'un donneur vers un receveur de même espèce, mais différent du donneur. Les autogreffes osseuses consistent à prélever du tissu osseux et à le greffer sur un même individu. Les xénogreffes osseuses consistent à transplanter du tissu osseux  
15 d'un animal (souvent porcin ou bovin) vers un individu humain.

Pour réaliser ces greffes, on part d'un tissu osseux que l'on traite pour le nettoyer mécaniquement et l'épurer de toutes les substances qui nuiraient à son implantation. Ce faisant, on constate, avec les traitements utilisés dans l'art antérieur, que les propriétés mécaniques du tissu osseux sont altérées. En effet, les substances organiques extraites participent aux propriétés mécaniques de l'os. Or, la greffe d'un  
20 implant osseux est en général réalisée à des fins de restructuration du squelette, dans une portion soumise à des problèmes de résistance où les propriétés mécaniques sont primordiales. En conséquence, il serait avantageux de disposer de greffons osseux ayant des propriétés mécaniques équivalentes à celles de l'os naturel, voire supérieures.

Par exemple, de tels greffons seraient indiqués dans des applications orthopédiques et en particulier  
25 lorsque le greffon est mis en charge, à savoir notamment : chirurgie du rachis (fusion cervicale, remplacement des disques lombaires, ...), reconstruction du fond de cotyle, chirurgie de reprise d'arthroplastie, ostéotomies, pseudarthroses, arthrodèses, ...

Ainsi, lorsque le greffon est utilisé pour restaurer une partie de squelette supportant une prothèse artificielle implantée (prothèse d'articulation, prothèse dentaire...), l'utilisation d'un greffon dont la résistance  
30 mécanique, notamment en compression, serait supérieure à celle de l'os d'origine qui s'est détérioré, constituerait un avantage déterminant du point de vue de la longévité de fonctionnement de la prothèse. Et, le greffon interposé entre la prothèse et l'os naturel rendrait les variations de propriétés mécaniques plus progressives et améliorerait la qualité de la transmission des contraintes en évitant des gradients localisés trop importants de résistance. Egalement, si le greffon a, dès son implantation, des résistances équivalentes  
35 à celles de l'os, on supprime tout risque de détérioration pendant la résorption du greffon par un tissu osseux néoformé.

L'invention vise donc à proposer un biomatériau implantable dont les propriétés mécaniques, notamment la résistance en compression, sont au moins équivalentes à celles de l'os naturel. Plus particulièrement, l'invention vise à proposer un biomatériau implantable dont la résistance en compression peut être  
40 comprise entre 1 et 2 fois celle de l'os naturel.

Par ailleurs, l'invention vise aussi à proposer un biomatériau qui améliore l'efficacité des greffes osseuses, tant du point de vue mécanique que du point de vue biologique.

En effet, les allogreffes présentent de nombreux inconvénients. Tout d'abord, les risques infectieux liés à la transmission du tissu osseux d'un individu vers un autre sont nombreux. Tel est le cas, notamment, en  
45 ce qui concerne la transmission du virus HIV du SIDA. Etant donné le développement important de cette maladie, un tel risque infectieux s'est considérablement accru ces dernières années. Outre ces risques infectieux, qui concernent également d'autres virus, les principales complications liées à l'utilisation d'allogreffes sont des fractures, une mauvaise recolonisation des tissus osseux implantés (greffons) et des rejets de l'implant. La mauvaise recolonisation des greffons pose aujourd'hui un problème important. En  
50 effet, les tissus du greffon sont sensés être résorbés, envahis puis remplacés par un tissu osseux néoformé. Mais cette réhabilitation est jusqu'à présent plutôt faible.

Un des buts de la présente invention est donc aussi de créer un tissu osseux implantable sûr au niveau infectieux et immunitaire.

Un autre but de l'invention est qu'un tel tissu osseux présente une bonne capacité ostéoconductrice  
55 (c'est-à-dire facilite une bonne recolonisation des greffons).

Les autogreffes sont souvent préférées aux allogreffes car elles sont mieux recolonisées et susceptibles d'apporter des cellules osseuses sur le site de la greffe. Il en résulte que les risques infectieux et immunitaires sont notablement réduits, mais ce type de pratique n'est pas totalement satisfaisante. En effet,

elle est douloureuse, souvent mal acceptée par le patient, et présente des risques de complication au niveau du site donneur. En outre, de nombreuses interventions requièrent de grandes quantités de tissu osseux incompatibles avec l'autogreffe.

Les xénogreffes osseuses présentent elles aussi de nombreux inconvénients. En général, ces greffes provoquent de fortes réactions immunitaires (rejet). Pour pallier cet inconvénient, diverses tentatives visant à atténuer ou supprimer ces réactions ont été effectuées. Leur principe réside généralement en une déprotéinisation du tissu osseux avant implant. En effet, les protéines contenues dans le tissu osseux sont à l'origine d'une partie des réactions de rejet. Ces réactions de rejet sont également liées à la présence de débris cellulaires dans les tissus médullaires et aux autres éléments de ces tissus.

Pour extraire les protéines du tissu osseux, il est connu d'utiliser des solvants organiques. Les solvants les plus utilisés sont : l'éthylène diamine, le peroxyde d'hydrogène, divers solvants chlorés tels le chloroforme ou le dichlorométhane, mais aussi l'éthanol et l'acétone. La plupart des tissus osseux ainsi déprotéinés ne présentent pas ou peu de réactions immunitaires. Ils sont généralement bien revascularisés et sont envahis par des cellules ostéogéniques du receveur. Cependant ils ne présentent pas eux-mêmes de propriétés ostéoinductrices. Leur résistance mécanique est généralement inférieure à celle de l'os naturel ou du même ordre.

On remarquera cependant que les solvants utilisés pour la déprotéinisation sont souvent hautement toxiques. De ce fait, les tissus osseux doivent être soigneusement rincés (ce qui n'est pas facile, étant donné leur porosité) pour éviter toute pollution du site receveur.

Le brevet FR-A-2.654.625 décrit un procédé de déprotéinisation utilisant de tels solvants toxiques associés à un agent d'extraction sélectif à base d'urée. Un tel procédé se solde malgré tout par une délipidation très hétérogène, puisque selon ce brevet il peut rester de 0,5 à 5 % de lipides.

Les fluides à l'état supercritique sont déjà connus pour extraire des matières diverses telles que lipides, protéines, nucléotides, saccharides de tissus ou organes d'animaux. Néanmoins, ces procédés connus sont considérés comme complexes et onéreux à mettre en oeuvre, sans fournir d'avantages prépondérants par rapport aux autres procédés d'extraction.

Ainsi, l'art antérieur n'enseigne pas la possibilité d'effectuer une extraction de matières organiques lors du traitement d'un tissu osseux à la suite de laquelle la résistance mécanique du tissu osseux est améliorée.

La présente invention a pour but de pallier l'ensemble des inconvénients de l'art antérieur et notamment de proposer un tissu osseux implantable de résistance améliorée par rapport à celle de l'os naturel, qui soit sûr au niveau infectieux et immunitaire, qui présente une bonne capacité ostéoconductrice et qui ne mette pas en oeuvre de produits toxiques. La présente invention a notamment pour but de proposer un procédé permettant le traitement d'un tel tissu osseux.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé de traitement de tissus osseux animaux ou humains pour l'obtention d'un biomatériau implantable sur un être humain et destiné à subir des contraintes mécaniques, dans lequel on nettoie mécaniquement le tissu osseux de toutes les matières organiques qui l'entourent et on extrait du tissu osseux les matières organiques, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape dans laquelle on fait pénétrer un fluide à l'état supercritique dans la totalité du tissu osseux.

Les inventeurs ont ainsi constaté avec surprise que le seul fait de placer le tissu osseux au contact d'un fluide supercritique au cours du traitement renforce sa résistance mécanique alors même que l'on extrait les matières organiques.

Selon l'invention, on fait pénétrer le fluide à l'état supercritique dans le tissu osseux lors d'une étape d'extraction des matières organiques essentiellement lipidiques présentes dans le tissu et qui sont solubilisées dans le fluide à l'état supercritique. L'extraction ainsi réalisée par ce fluide supercritique présente des qualités qui se trouvent particulièrement appropriées au tissu osseux.

Selon l'invention, le procédé consiste à :

- a) nettoyer mécaniquement le tissu osseux de toutes les matières organiques qui l'entourent,
- b) découper ce tissu osseux selon une forme prédéterminée,
- c) nettoyer le tissu osseux pour en extraire des constituants nocifs à une bonne réimplantation, en faisant pénétrer dans la totalité du tissu osseux, un fluide à l'état supercritique adapté pour solubiliser et extraire les matières organiques essentiellement lipidiques présentes dans ce tissu,
- d) laver, déshydrater et stériliser le tissu osseux ainsi nettoyé. L'étape de nettoyage c) consiste en outre à traiter de manière chimique et/ou enzymatique le tissu osseux pour en extraire des protéines spécifiques restantes.

Le fluide à l'état supercritique c est-à-dire présentant une viscosité dynamique faible (proche de celle d'un gaz), un coefficient de diffusion élevé, une très faible tension interfaciale et une masse volumique élevée (proche de celle d'un liquide) diffuse facilement à travers le matériau poreux sans aucun problème



de mouillabilité. En outre, le pouvoir solvant d'un tel fluide est élevé (proche de celui des liquides et pouvant atteindre  $10^8$  fois celui d'un gaz), et peut être modulé en faisant varier la pression. Il en résulte qu'un tel fluide à l'état supercritique dissout facilement et pratiquement totalement les matières organiques essentiellement lipidiques présentes dans le tissu osseux. Les risques immunitaires et infectieux s'en trouvent considérablement amoindris.

Un des avantages de l'invention réside dans l'utilisation du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en tant que fluide à l'état supercritique, en effet, ce composant présente de nombreuses propriétés intéressantes, à savoir :

- sa température critique, de  $31^\circ \text{C}$ , est basse. On peut ainsi avoir du dioxyde de carbone à l'état supercritique en travaillant à une température de l'ordre de  $31^\circ$  pour une pression de l'ordre de 7,38 MPa. Selon la pression appliquée, on peut donc travailler à des températures comprises entre  $31^\circ$  et  $60^\circ \text{C}$  auxquelles la seule altération du tissu osseux possible est une dénaturation du collagène qui lui enlève son caractère antigénique,
- son pouvoir solvant est excellent, en particulier pour les lipides. Il est par exemple connu que de nombreux acides gras et triglycérides peuvent avoir des solubilités dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique pouvant aller jusqu'à 10%. Or ces lipides sont présents en grande quantité dans les tissus médullaires qui imprègnent l'os spongieux, ils sont fortement antigéniques et toujours très difficiles à éliminer ; de plus n'étant pas mouillables, ils constituent une barrière physique prévenant la recolonisation du greffon,
- il renforce les propriétés biomécaniques de l'os et favorise l'ostéointégration du tissu osseux implanté,
- c'est un produit naturel dépourvu de toute toxicité,
- il est facile à se procurer et ne présente pas de danger ni pour le produit traité, ni pour l'expérimentateur.

Avantageusement, le traitement du tissu osseux est complété par un traitement chimique ou enzymatique plus particulièrement adapté pour extraire les matières protéiques présentes dans le tissu osseux.

La présente invention concerne également un biomatériau implantable obtenu selon le procédé ci-dessus indiqué, et constitué par un tissu osseux épuré et ayant été placé au contact d'un fluide à l'état supercritique, ledit tissu étant adapté pour être implanté chez l'homme au niveau d'un tissu osseux lésé.

Selon l'invention, le tissu osseux a été épuré des matières organiques essentiellement lipidiques par extraction à l'aide du fluide à l'état supercritique.

Un tel matériau présente une résistance équivalente ou supérieure à celle de l'os naturel, est sûr au niveau infectieux et immunitaire, ne présente pas de toxicité, et du fait de l'extraction quasi complète des lipides qu'il contenait à l'origine, offre une bonne capacité ostéoconductrice.

D'autres objets, caractéristiques et avantages de la présente invention, ressortiront de la description qui va suivre, à titre d'exemple non limitatif, qui se réfère au schéma annexé représentant une installation pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

L'installation représentée sur la figure comporte un réacteur 1 dans lequel on place le tissu osseux 2 et à travers lequel on entretient un courant de dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  à l'état supercritique.

Le dioxyde de carbone est stocké à l'état liquide dans une bouteille 3, traverse un filtre 4, est refroidi par un groupe réfrigérant 5 à une température où il est certainement liquide, de l'ordre de  $0^\circ \text{C}$ , puis introduit dans un réservoir tampon 6. Une pompe 7 doseuse est placée en aval du réservoir 6 pour comprimer le dioxyde de carbone liquide à une pression permettant son passage à l'état supercritique. Une vanne 8 est placée en aval de la pompe 7 pour isoler le réacteur 1 en vue de son chargement ou de son déchargement. Avant son introduction dans le réacteur 1, le dioxyde de carbone est réchauffé par un réchauffeur 9, de sorte qu'à la sortie de ce réchauffeur 9, le dioxyde de carbone se trouve à l'état supercritique. Le dioxyde de carbone traverse le réacteur 1 et en sort à une extrémité opposée à son extrémité d'introduction. Une vanne 10 est placée en aval du réacteur 1 pour permettre de l'isoler du circuit. La vanne 10 permet également de réaliser une chute de pression avant l'introduction du dioxyde de carbone dans un premier séparateur 11. Les matières dissoutes dans le dioxyde de carbone sont récupérées à la sortie 12 du séparateur 11. L'installation comprend aussi un deuxième étage de séparation comprenant une vanne 13 faisant encore chuter la pression et un deuxième séparateur 14 ayant une sortie 18 de récupération des matières organiques. On peut prévoir plus de deux étages de séparation, selon les besoins. Le dioxyde de carbone, à la sortie 12, 18 des étages de séparation, est recyclé dans le circuit par l'intermédiaire d'une vanne 15. La bouteille 3 est reliée à ce circuit fermé par l'intermédiaire d'un clapet anti-retour 16 et d'une vanne 17.

Le procédé de traitement de tissu osseux selon l'invention est décrit ci-après.

De manière classique, on procède en premier lieu à un nettoyage mécanique de l'os, puis à sa découpe aux dimensions souhaitées et selon une forme prédéterminée. La forme du tissu osseux peut par exemple être un parallélépipède rectangle, un cylindre ou toute autre forme appropriée. Ce tissu osseux est

alors placé dans le réacteur 1 d'extraction. Les conditions opératoires optimales sont réunies pour une température comprise entre 31 ° et 60 ° C et une pression de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^7$  à  $4 \cdot 10^7$  Pa.

Le dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$ , est pompé sous forme liquide par la pompe 7 doseuse. Ce liquide est préchauffé en amont du réacteur 1 d'extraction afin d'être introduit dans celui-ci à l'état supercritique.

5 On rappelle que les fluides à l'état supercritique peuvent être définis comme des gaz placés dans des conditions de température et de pression telles que leurs propriétés sont intermédiaires entre celles des gaz et celles des liquides. On les nomme encore "gaz denses" ou "liquide expansé". Pour un corps chimique donné, le point précis du diagramme température-pression pour lequel les deux phases liquide et vapeur n'en forment plus qu'une est appelé point critique. Au-delà de cette température critique ( $T_c$ ) et de  
10 cette pression critique ( $P_c$ ), le fluide est en l'état dit "supercritique".

En traversant le réacteur 1, le dioxyde de carbone à l'état supercritique solubilise une grande partie des matières organiques, essentiellement lipidiques de l'os. En particulier, il dissout les graisses des tissus médullaires contenues dans le tissu osseux.

15 En raison des propriétés des fluides supercritiques, cette extraction est très efficace. Notamment, les graisses normalement inaccessibles aux solvants chimiques utilisés dans les procédés connus sont extraites avec le dioxyde de carbone à l'état supercritique.

Pour contrôler l'extraction lipidique réalisée par le dioxyde de carbone, on vide en permanence les séparateurs 11 et 14 de l'extrait en récupérant les résidus gras. On laisse le tissu osseux au contact du dioxyde de carbone supercritique pendant qu'un débit de résidus gras est récupéré à la sortie 12, 18 des  
20 séparateurs 11, 14. La durée du traitement varie en fonction du poids de tissu osseux à traiter et du débit de dioxyde de carbone supercritique introduit dans le réacteur 1. On peut ainsi interrompre le procédé en contrôlant la masse de dioxyde de carbone traversant le tissu osseux dont la masse est elle-même déterminée. On sait en effet que le rendement massique de l'extraction est une constante. Ainsi, à l'aide d'un débitmètre massique placé en série à la sortie du réacteur 1, on peut interrompre le procédé lorsque  
25 la masse de dioxyde de carbone utilisé est suffisante.

On notera que les éléments extraits se composent à plus de 98 % de graisse. Le tissu osseux quant à lui, contient après traitement en moyenne moins de 2 % de graisse, et ceci de manière homogène. Et sa résistance à la compression est de l'ordre de 10 à 20 MPa.

30 On notera que, contrairement à ce qui se passe de manière classique dans un réacteur chimique, ce n'est pas l'extrait (matière essentiellement lipidique) qu'on utilise par la suite, mais le reliquat (le tissu osseux).

Et le fluide à l'état supercritique présente ainsi la double fonction de renforcer le matériau osseux, ce qui améliore ses propriétés biomécaniques, et d'épurer le matériau osseux.

35 Le tissu osseux ainsi traité subit une action complémentaire classique de traitement chimique ou enzymatique pour extraire des protéines spécifiques. Le traitement complémentaire chimique peut être réalisé à partir de peroxyde d'hydrogène, tandis que le traitement enzymatique peut être effectué à l'aide de protéase. Ce traitement complémentaire assure une meilleure extraction des protéines du tissu osseux et diminue d'autant le risque de rejet du tissu osseux ainsi traité.

40 Ensuite, le tissu osseux est soumis à un lavage. Ce lavage est réalisé dans plusieurs bains successifs d'eau distillée à une température comprise entre 30 ° et 60 ° C.

Une étape de déshydratation et de désinfection du tissu osseux est ensuite réalisée. Cette étape est réalisée par passage dans plusieurs bains successifs d'éthanol de concentration croissante, par exemple 70, 95 et 100 %. On notera que l'éthanol étant un excellent virucide, il permet simultanément de déshydrater le tissu et d'accroître la sécurité infectieuse du biomatériau. Un séchage en étuve ventilée à  
45 une température comprise entre 30 et 60 ° C complète ce procédé.

Le tissu osseux est alors soumis à une stérilisation après avoir été emballé. Cette stérilisation peut être effectuée par irradiation soit aux particules bêta, soit aux rayons gamma (25 k Gray). Une éventuelle nouvelle taille du tissu osseux avant implant est possible pour l'adapter au tissu osseux receveur. En effet, le tissu osseux ainsi traité est relativement dur et peut se retailler sans s'effriter.

50 Dans le tableau ci-après, on trouvera les résultats d'analyses d'un tissu osseux non traité (exemple 1), d'un tissu osseux traité uniquement à l'aide du  $\text{CO}_2$  à l'état supercritique (exemple 2), et de tissus osseux traités au  $\text{CO}_2$  et ayant subi une étape complémentaire, soit chimique (exemple 3), soit enzymatique (exemple 4).

55 Les valeurs respectives de teneur en matière organique MO, en carbone organique C, en azote N, en résidu lipidique (lipides) et la résistance à la compression sont données pour chacun de ces quatre exemples. Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes ; entre parenthèses est donné l'intervalle de tolérance.

Les tissus osseux analysés proviennent d'extrémités distales de fémur de bovin.

		Exemple 1 : os non traité	Exemple 2 : os traité au CO <sub>2</sub>	Exemple 3 : os traité au CO <sub>2</sub> + peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Exemple 4 : os traité au CO <sub>2</sub> + protéase
5	MO (%)	62,7 (50,0-70,3)	23,0 (21,6-25,7)	20,8 (18,9-21,9)	20,6 (16,1-23,6)
	C (%)	44,8 (43,1-46,5)	10,8 (10,1-12,4)	9,2 (8,7-10,3)	9,8 (8,8-11,6)
	N (%)	2,4 (2,2-2,6)	4,1 (3,9-4,3)	3,9 (3,3-4,3)	4,0 (3,0-4,7)
10	lipides (%)	51,3 (24,7-77,3)	1,9 (0,6-5,3)	1,5 (0,8-3,0)	1,7 (0,8-2,8)
	Résistance à la compression	8,9 MPa	16,9 MPa	10,7 MPa	11,5 MPa

15 Une deuxième série d'essais identiques a été réalisée à partir d'os bovins d'une autre origine. Dans le tableau ci-après, les résultats sont donnés en moyenne sur 38 mesures pour les exemples 1 et 4, 39 mesures pour l'exemple 2 et 28 mesures pour l'exemple 3.

		Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	Exemple 4
20	MO (%)	62,1	22,8	19,6	20,6
	C(%)	46,6	10,8	8,6	9,6
	N(%)	2,4	4,1	3,6	4,1
25	lipides (%)	51,0	1,1	0,7	1,3
	Résistance à la compression	10,42 MPa	14,91 MPa	10,65 MPa	11,54 MPa

30 Par rapport au seul traitement avec un fluide à l'état supercritique (exemple 2), on constate, pour les exemples 3 et 4, une baisse des teneurs en carbone et en azote, et plus généralement en matière organique. Cette baisse correspond à l'élimination de la fraction non lipidique des tissus médullaires ainsi qu'à la solubilisation des protéines solubles du tissu osseux. Cette opération permet de réduire considérablement les réactions inflammatoires et améliore encore l'ostéoconduction comme l'ont montré des expériences effectuées sur l'animal.

35 On notera que les propriétés biomécaniques de ces implants sont statistiquement meilleures que celles de l'os, à partir duquel ils sont réalisés (exemple 1). En effet, la résistance à la compression d'un tissu osseux traité est supérieure à celle du tissu osseux témoin non traité.

On notera en variante du procédé ci-dessus décrit, que les étapes de nettoyage et de découpage du tissu osseux peuvent être effectuées de la manière suivante.

40 L'étape de nettoyage peut être effectuée en utilisant un procédé de sablage où du corindon (alumine) est envoyé sous une pression comprise entre  $4 \cdot 10^5$  et  $10^6$  Pa sur l'os afin de le débarrasser de tous les tissus mous adhérents, y compris le périoste. Cette technique est beaucoup plus rapide et efficace que les méthodes traditionnelles qui sont toutes manuelles alors que le sablage peut être effectué dans des appareils robotisés entièrement automatiques.

45 L'étape de découpe peut, quant à elle, être une découpe par jet d'eau. Une telle découpe permet une précision pouvant aller jusqu'à  $10 \mu\text{m}$ , elle est effectuée par un jet d'eau pure évitant donc tout risque de pollution par l'outil de découpe et elle est industrialisable.

50 Bien entendu, la présente invention n'est pas limitée au mode de réalisation choisi et englobe toute variante à la portée de l'homme du métier. Ainsi, l'étape de nettoyage chimique réalisée à l'aide d'un fluide à l'état supercritique peut être complétée par l'ajout d'un fluide dissous dans le fluide à l'état supercritique, et dont l'action spécifique sur le tissu osseux pourra avoir lieu dans le réacteur même.

55 Il est alors possible de réaliser l'ensemble des réactions de déprotéinisation et de délipidation dans un même lieu (le réacteur) et en même temps. En outre, le fluide ainsi dissous dans le fluide à l'état supercritique se trouve à une température et à une pression extrêmement favorables pour ce type de réaction.

Ainsi, si on souhaite éliminer des protéines des tissus médullaires ou de la matrice extracellulaire osseuse, ou encore des débris cellulaires d'origine médullaire et dont le haut pouvoir antigénique est en grande partie responsable de réponses immunitaires, on peut avantageusement introduire dans le circuit du



réacteur, des détergents, des oxydants de la matière organique, des enzymes spécifiques de telle ou telle réaction et plus généralement toute substance adéquate pour le traitement souhaité dans la mesure où elle est solubilisée par le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique.

On notera que le procédé et le biomatériau ci-dessus décrits peuvent être réalisés à partir d'os humains ou animaux. Ils sont applicables à la réalisation d'un greffon, notamment pour des applications orthopédiques, et dans les applications où le greffon subit des contraintes mécaniques, par exemple : chirurgie du rachis (fusion cervicale, remplacement des disques lombaires, ...), reconstruction du fond de cotyle, chirurgie de reprise d'arthroplastie, ostéotomies, pseudarthroses, arthrodèses, ...

## 10 Revendications

1. Procédé de traitement de tissus osseux animaux ou humains pour l'obtention d'un biomatériau implantable sur un être humain et apte à subir des contraintes mécaniques, dans lequel on nettoie mécaniquement le tissu osseux de toutes les matières organiques qui l'entourent et on extrait du tissu osseux les matières organiques, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape dans laquelle on fait pénétrer un fluide à l'état supercritique dans la totalité du tissu osseux.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on place le tissu osseux dans un courant de fluide supercritique qui le traverse.
3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite étape est une étape dans laquelle on extrait les matières organiques essentiellement lipidiques présentes dans le tissu qui sont solubilisées dans le fluide à l'état supercritique.
4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à :
  - a) nettoyer mécaniquement le tissu osseux de toutes les matières organiques qui l'entourent,
  - b) découper ce tissu osseux selon une forme prédéterminée,
  - c) nettoyer le tissu osseux pour en extraire des constituants nocifs à une bonne réimplantation, en faisant pénétrer dans la totalité du tissu osseux, un fluide à l'état supercritique adapté pour solubiliser et extraire les matières organiques essentiellement lipidiques présentes dans ce tissu,
  - d) laver, déshydrater et stériliser le tissu osseux ainsi nettoyé.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'étape de nettoyage c) consiste en outre à traiter de manière chimique et/ou enzymatique le tissu osseux pour en extraire des protéines spécifiques restantes.
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide à l'état supercritique utilisé est du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> à l'état de fluide supercritique présente une température de l'ordre de 31 ° à 60 ° C, et est soumis à une pression de l'ordre de 1,5.10<sup>7</sup> à 4.10<sup>7</sup> Pa.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide à l'état supercritique contient des fluides spécifiques dissous, ces fluides spécifiques étant adaptés pour extraire du tissu osseux des protéines ou autres substances spécifiques.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que des fluides spécifiques adaptés pour extraire du tissu osseux des protéines spécifiques sont utilisés dans une étape de lavage effectuée après l'étape dans laquelle le fluide à l'état supercritique est utilisé.
10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on nettoie mécaniquement le tissu osseux par sablage à l'alumine.
11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on découpe le tissu osseux par jet d'eau sous haute pression.



12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'après le traitement du tissu osseux par le fluide à l'état supercritique, on le lave par passage dans plusieurs bains successifs d'eau distillée à une température comprise entre 20 ° et 60 ° C.
- 5 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'après avoir lavé le tissu osseux, on le déshydrate et on le désinfecte par passage dans plusieurs bains successifs d'éthanol de concentration croissante, puis par un séchage en étuve ventilée à une température comprise entre 31 ° et 60 ° C.
- 10 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'après avoir déshydraté le tissu osseux, on le stérilise après emballage par irradiation.
- 15 15. Biomatérial implantable obtenu selon le procédé conforme à l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est constitué par un tissu osseux épuré et ayant été placé au contact d'un fluide à l'état supercritique, ledit tissu étant adapté pour être implanté chez l'homme au niveau d'un tissu osseux lésé.
16. Biomatérial selon la revendication 15, caractérisé en ce que le tissu osseux a été épuré des matières organiques essentiellement lipidiques par extraction à l'aide du fluide à l'état supercritique.
- 20 17. Biomatérial selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente un résidu lipidique inférieur à 2 % et une résistance à la compression de l'ordre de 10 à 20 MPa.

25

30

35

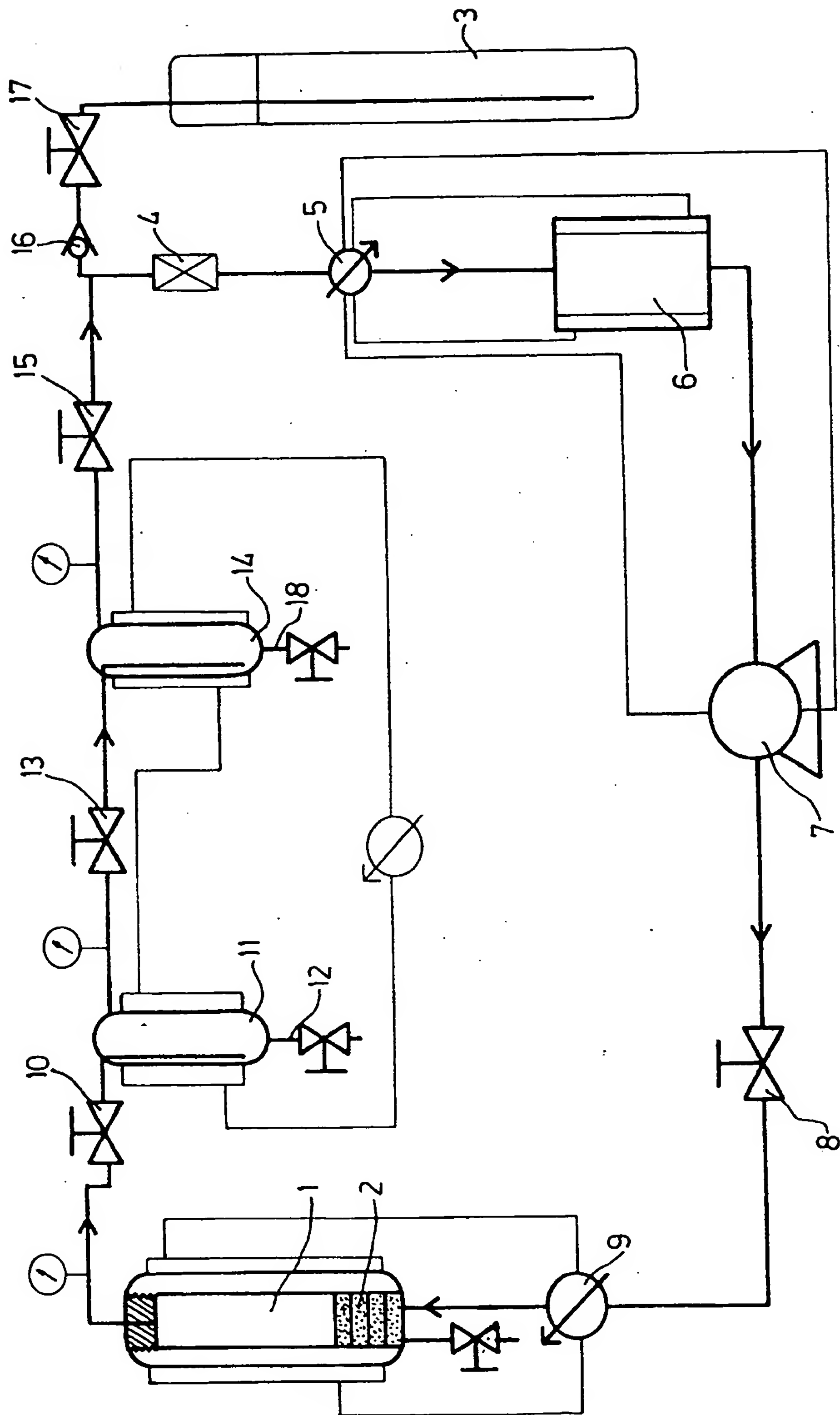
40

45

50

55

Figure unique





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande  
EP 93 20 3267

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
A	WO-A-87 03812 (ANGIO-MEDICAL CORP.) * page 9 - page 10 * * page 14 - page 16 * ---	1-17	A61L27/00
A	GB-A-2 175 506 (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORP.) * revendications * ---	1	
D,A	WO-A-91 07194 (TRANSPHYTO S.A.) * revendications * & FR-A-2 654 625 (TRANSPHYTO S.A.) -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
			A61L
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
LA HAYE		22 Mars 1994	ESPINOSA, M
<div>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</div> <div><div>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</div><div>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- &amp; : membre de la même famille, document correspondant</div></div>			

EPO FORM 1503 01.92 (P04 COI)